

マウス自然発生癌の腫瘍内浸潤リンパ球に関する研究

高 橋 衛

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任: 関山三郎教授)

[受付: 1991 年 12 月 26 日]

[受理: 1992 年 1 月 7 日]

Abstract: Differences in immune responses between immunized and non-immunized mice were studied with special reference to tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), using inbred WHT/Ht mice with spontaneously developing transplantable squamous cell carcinoma. After inoculating 1×10^6 tumor cells, a lymphocyte-proliferating response was observed in the spleens and regional lymph nodes of both immunized and non-immunized mice. Histological examination showed marked infiltration of lymphoid cells into tumor tissues of immunized mice, but was much less in non-immunized mice. Lymphocyte subset analysis by a fluorescent antibody method and FACScan indicated that TIL in the immunized mice consisted mostly of surface-Ig⁺, Mac-1⁺ and asialo GM1⁺ cells. This almost completely agreed with the distribution of spleen cells. However, in non-immunized mice, Lyt-1⁺ and L3T4⁺ cells were dominant, differing from the distribution of spleen cells. Furthermore, the killer activity of these TIL and spleen cells against syngeneic tumor cells was studied by ⁵¹Cr release assay. Results showed that TIL and spleen cells of immunized mice had cytolytic, natural killer, and ADCC activities, but none of these could be detected in the non-immunized mice.

The above findings suggest that infiltration of TIL is an expression of immune response of the tumor-bearing host against tumor-rejection antigens. At the site of tumor transplantation in immunized mice various effector cells having anti-tumor activity act toward tumor rejection.

諸 言

ヒト癌組織内部および周囲にリンパ球浸潤が認められることが古くから知られており¹⁻³⁾, その腫瘍内浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes, 以下 TIL と略す) の浸潤程度と癌の進展度, リンパ節転移, および患者の予後とは多くの場合有意に相関することが報告されている²⁻⁶⁾。さらに, その著しいキラー活性が *in*

vitro で証明されたことから, TIL を用いた養子免疫療法が新しい免疫療法として注目されており, 臨床においてもかなりの効果が得られている⁷⁻⁹⁾。

これらのことから TIL の浸潤は, 腫瘍に対する生体の免疫応答の反映であり, それは腫瘍細胞増殖局所において最も直接的に現れると考えられる。従来の知見では, ヒト癌組織における TIL は多様であり^{9,10)}, 発生する癌細胞側の

A study on tumor infiltrating lymphocytes in mice with spontaneous carcinoma.

Mamoru TAKAHASHI

(Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

岩手県盛岡市中央通 1 丁目 3-27 (020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 17: 16-32, 1992

要因が宿主側の応答するリンパ球の phenotype, 機能発現, 特異性などを規定していると考えられているが, その詳細は明らかでない。したがって, TIL について検索することは, 宿主の抗腫瘍性のメカニズムを解明し, ひいては癌免疫療法の発展につながるものと考えられる。また, TIL に関する動物腫瘍系の研究は, 高抗原性の誘発癌を用いて展開されてきた^{7, 11)}が, ヒト癌と同様に低抗原性とされている動物の自然発生癌を使用した報告はほとんどない^{12, 13)}。

そこで本研究では, 近交系 WHT/Ht マウスに自然発生した扁平上皮癌の継代移植腫瘍を用い, 免疫, および非免疫マウスの TIL を分離し, その性状ならびに機能について解析し, 腫瘍に対する生体の免疫応答の差異を検討したので報告する。

材料および方法

1. マウス

当教室で兄妹交配により, 近交系として維持している WHT/Ht マウス¹⁴⁾ (H-2 K^a, H-2 D 不明)¹⁵⁾ の 8~12 週齢, 雌, 体重 25~27 g のものを使用し, 固形飼料 (オリエンタル酵母工業) と水を自由に与え飼育した。

2. 腫瘍

近交系 WHT/Ht マウスに自然発生し, 胸部皮下に継代移植している扁平上皮癌を使用した。この腫瘍は, TD₅₀ 値が 14.4¹⁶⁾ と極めて低免疫原性の腫瘍である。

3. 腫瘍細胞浮遊液の調整

近交系 WHT/Ht マウスに継代移植している腫瘍を, マウスから無菌的に摘出し, ダルベッコ PBS (ニッスイ, 以下 PBS と略す) で洗浄後, 剪刀で細切し, #150 白金メッシュで濾過した。これに 0.25% trypsin (DIFCO, U.S.A.) を加え攪拌し, 細胞浮遊液とした後, PBS で 1200 rpm, 3 回遠心洗浄し, PBS に再浮遊して使用した。生細胞数の算定は 0.2% トリパンブルー染色を行ない, 細胞の viability は各ロットとも 90% 以上であった。

4. 免疫マウスの作製

マウスの免疫方法は, Ibayashi らの方法¹⁷⁾に準じ, 外科的切除法と mitomycin C 処理腫瘍細胞の反復接種により行なった。1 × 10⁶ 個の腫瘍細胞を背部皮内に移植し, 7~10 日後, 腫瘍径が約 10 mm に達した時点で外科的に腫瘍を切除した。その 7 日後より 1 週間おきに, 1 × 10⁶ 個/ml あたり 25 μg の mitomycin C (和光純薬) で 37°C, 1 時間処理した腫瘍細胞の 1 × 10⁶ 個を, マウス皮内に接種する操作を 6 回繰り返した。最終免疫の 4 日後に, 1 × 10⁶ 個の腫瘍細胞を再接種し, 腫瘍を拒絶したマウスを免疫マウス (immunized mice, 以下 I 群と略す) とし, 実験に供した。また, 免疫操作を加えないものを非免疫マウス (non-immunized mice, 以下 N 群と略す) とし, 実験は, I 群と N 群の 2 群にて行なった。

5. 担癌マウスの経日的観察

担癌マウスについては, 腫瘍移植局所の組織学的検索, 脾臓の重量測定, および腋下リンパ節の大きさの経日的変化の観察を I 群と N 群マウスにおいて比較検討した。マウスの左側胸部に 1 × 10⁶ 個の腫瘍細胞を移植し, 移植後 2 日, 4 日, 6 日, 8 日, 10 日後の腫瘍移植局所の反応を, H.E. 染色にて組織学的に観察した。

同時に, 脾臓の重量を測定し, 以下の式で spleen index¹⁸⁾ を求めた。

$$\text{Spleen index} = \text{脾重量 (mg)} / \text{体重 (g)}$$

さらに, 腫瘍移植側腋下リンパ節の縦径と横径をノギスで測定し, その平均値をリンパ節の大きさとした。対照群として, 右側胸部に PBS 0.1 ml を接種し, 同様にリンパ節の大きさを測定した。実験はすべて 1 群 15 匹とし, 各日につき 3 匹を使用し, 各群の平均値と標準偏差を求めた。

6. TIL の免疫組織学的検索

TIL の免疫組織学的検索を, 蛍光抗体法¹⁹⁾で行なった。使用した抗体は, 1 次抗体として, マウス T 細胞マーカーである Anti-Lyt-1 モノクローナル抗体 (BECTON DICKINSON, U.S.A.), マウス killer/suppressor T 細胞に対応す

る Anti-Lyt-2 モノクローナル抗体 (BECTON DICKINSON, U. S. A.), マウス helper / inducer T 細胞に対応する Anti-L 3 T 4 モノクローナル抗体 (BECTON DICKINSON, U.S. A.), マウス macrophage (以下 M ϕ と略す) に対応する Anti-Mac-1 モノクローナル抗体 (Boehringer Mannheim Biochemica, Germany), マウス natural killer (以下 NK と略す) 細胞に対応する Anti-asialo GM 1 抗体 (和光純薬) を用いた。2 次抗体は, Anti-Lyt-1, Lyt-2, L 3 T 4, Mac-1 抗体に対して, FITC 標識 affinity purified anti-rat IgG (Kirkegaard & Perry Laboratories) を使用した。Anti-asialo GM 1 抗体に対する 2 次抗体は FITC 標識 affinity purified anti-rabbit Ig (TAGO) を使用した。また, 表面免疫グロブリン surface-immunoglobulin (以下, s-Ig と略す) の検出には, FITC 標識 anti-mouse Ig (Amersham) を使用した。

免疫組織学的検索をするために, 各群マウスの左側胸部に 1×10^6 個の腫瘍細胞を移植し,

Collect a tumoral mass aseptically.

↓
Cut into thin slices with a scissor blade.

↓
Filter through a #150 Pt mesh.

↓
Wash three times with PBS (1,200 rpm for 5 min.) .

↓
Adjust to 1×10^6 to 10^7 with RPMI 1640 culture medium containing 5% FBS.

↓
Overlay 4 ml of cell suspension gently on 3 ml of M-SMF (mouse lymphocyte isolate solution prepared by Japan Antibody Institute) .

↓
Centrifuge at 1,200 xg for 20 min.

↓
Collect lymphocytes (floating like a white band in the middle layer) .

↓
Wash three times with RPMI 1640 culture medium containing 5% FBS. Float in culture broth.

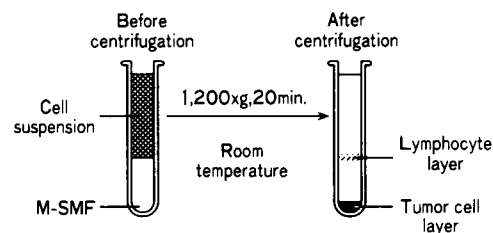
↓
Confirm the viability of cells with trypan blue and adjust to an optimum concentration.

↓
Use for assay.

移植後 2 日, 4 日, 6 日, 8 日, 10 日目の腫瘍組織を切り出し試料とした。試料はアセトンドライアイスで冷却したイソペンタン中で凍結し, クリオスタットで $4 \sim 6 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。これを 0.01% ポリ-L-リジン (SERVA, New York) 塗布スライドガラスに拾い, 室温で 30 分間乾燥させた。アセトンで室温, 10 分間固定し, 0.01 M PBS (IATRON) で 5 分間, 3 回洗浄後 (以後, 各反応の間も同様に洗浄), 正常ヤギ血清を室温で 20 分間反応させた。次に, 1 次抗体をそれぞれ適切な濃度としたものを滴下し, 室温で 2 時間反応させた。続いて, 2 次抗体を滴下し, 室温で 2 時間反応させ, グリセリンで封入後, 蛍光顕微鏡で検鏡した。

7. TIL の分離および調整²⁰⁾ (Fig.1)

無菌的に採取した腫瘍組織を, 剪刀で細切し, #150 白金メッシュで濾過した。これを PBS で 1200 rpm, 3 回遠心洗浄後, 10% Fetal Bovine Serum (FBS, GIBCO), ストレプトマイシン硫酸塩 ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) およびペニシリン



*Isolate and adjust spleen cells by a specific gravity centrifugation method using the same procedures.

Fig. 1. Isolation and adjustment of TIL

G カリウム (100 単位 /ml) を添加した L-グルタミン含有, RPMI 1640 (GIBCO) で 1×10^6 個 /ml の濃度に調整した。これの 4 ml を, マウスリンパ球比重分離液 (M-SMF, 比重 1.090 ± 0.001 , 日本抗体研究所) 3 ml に静かに重層し, 1200 g, 20 分間遠心した。遠心後, 中間層のリンパ球分画を回収し, RPMI 1640 で 1200 rpm, 3 回遠心洗浄後, RPMI 1640 に再浮遊させた。0.2% トリパンブルー染色で viability を確認後, 調整し実験に供した。

8. 脾細胞浮遊液の作製

エーテル麻酔で屠殺したマウスより, 無菌的に脾臓を摘出した。これを, RPMI 1640 を入れたプラスチックシャーレ (Falcon) 上で, 注射針とピンセットを用いてほぐした。#150 白金メッシュで濾過し, PBS で洗浄後, RPMI 1640 に再浮遊させた。これより前述の M-SMF を用いた比重遠心法でリンパ球分画を分離し, 実験に供した。

9. リンパ球 subset 分析²¹⁾

各群マウスの腫瘍移植後 6 日目の腫瘍組織から得た TIL, および脾細胞のリンパ球 subset 分析を, FACScan (BECTON DICKINSON) で行なった。対照群としては正常マウスの脾細胞を用いた。各細胞浮遊液 1×10^6 個 /test に, 各種モノクローナル抗体 (Anti-Lyt-1 抗体, Anti-Lyt-2 抗体, Anti-L3T4 抗体, Anti-Mac-1 抗体, Anti-asialo GM 1 抗体) を添加し, 氷上で 30 分反応させた。0.1% Bovine Serum Albumin (BSA, STRATAGENE), 0.1% NaN_3 (和光純薬) 添加 PBS で 2 回洗浄後, 2 次抗体として FITC 標識 anti-rat IgG, FITC 標識 anti-rabbit IgG を添加し, 氷上で 30 分, 暗所にて反応させた。0.1% BSA, 0.1% NaN_3 添加 PBS で 2 回洗浄後, 0.5 ml に懸濁し, 氷上で遮光し 2 時間以内に解析した。

10. 細胞傷害活性の測定²²⁾

各群マウスの TIL, 脾細胞の腫瘍細胞, および NK 細胞感受性 YAC-1 細胞²³⁾ に対する細胞傷害活性を, ^{51}Cr release assay で測定した。

1) 腫瘍細胞の ^{51}Cr 標識

腫瘍細胞, YAC-1 細胞をそれぞれ 10% FBS, 炭酸水素ナトリウム (1 mg/ml), L-グルタミン (300 μg /ml, 和光純薬) 添加 EAGLE'S MEM (ニッスイ, 以下 MEM と略す) で 1×10^6 個 /ml の濃度に調整し, 細胞 1×10^6 個あたり 3.7 MBq の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (日本アイソトープ協会) を加え, 37°C, 5% CO_2 下で時々振盪させながら 60 分間培養し標識した。反応後, MEM で 3 回遠心洗浄後, 20 ml の MEM を加え 37°C, 5% CO_2 下で 2 時間前培養を行なった。MEM で 3 回遠心洗浄後, 1×10^5 個 /ml の濃度に再浮遊させた。

2) ^{51}Cr release assay

Effector 細胞として, 各群マウスの TIL, 脾細胞, 正常マウスの脾細胞を E/T 比が 100 : 1, 50 : 1, 25 : 1, 12.5 : 1 となるように 96-well round-bottomed microtiter plate (Falcon, U.S.A) に 100 μl ずつ分注した。次に, target 細胞として ^{51}Cr で標識した腫瘍細胞を 1×10^4 個 / 100 μl ずつ各 well に分注し, 総量 200 μl / well とした。対照群として, effector 細胞の代わりに MEM を 100 μl 加えたものを自然遊離とし, 0.2% Triton X (半井化学薬品) 100 μl を加えたものを最大遊離とした。37°C, 5% CO_2 下で 12 時間培養後, 上清を Titertek 上清採取システム (Skatron, Norway) により採取し, γ -カウンター (ARC-351, Aloka) で放射活性を測定した。実験はすべて triplicate で行ない, 細胞傷害活性は以下の式で求めた。

細胞傷害活性 (%)

$$= \frac{\text{実験群遊離cpm} - \text{自然遊離cpm}}{\text{最大遊離cpm} - \text{自然遊離cpm}} \times 100$$

11. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) 活性の測定²⁴⁾

各群マウスの TIL, 脾細胞の腫瘍細胞に対する ADCC 活性を前述の ^{51}Cr release assay で測定した。Target 細胞として ^{51}Cr 標識腫瘍細胞を 1×10^4 個 / 100 μl , effector 細胞として, 各群 TIL, 脾細胞を, E : T 比が 100 : 1 となるように, 96-well round-bottomed microtiter

plate の各 well に分注した。次に、各群マウスより採取し、56°C、30 分で非働化した血清を、最終濃度が 1/5, 1/20, 1/80, 1/320 となるように各 well に加えた。対照群は、血清を加えず、 ^{51}Cr 標識腫瘍細胞に effector 細胞のみを加えたものとした。37°C、5%CO₂ 下で 6 時間培養後、Titertek 上清採取システムで上清を採取し、 γ -カウンターで放射活性を測定した。実験はすべて triplicate で行ない、ADCC 活性は以下の式で求めた。

ADCC 活性 (%)

$$= \{(\text{実験群 cpm} / \text{対照群 cpm}) - 1\} \times 100$$

12. 統計学的処理

推計学的検定は、Student's *t*-test を用いた。

実験結果

1. 腫瘍移植局所の組織学的所見

腫瘍は、低分化型扁平上皮癌であった (Fig. 2)。I 群では、腫瘍移植後 2 日目には、顆粒球を主体とする炎症性細胞浸潤が認められた。4 日目から 6 日目に、腫瘍組織周辺部から腫瘍組織全体に著明な単核球浸潤が認められ、経時的にその数が増加していった。同時に、腫瘍細胞の変性破壊が認められ、8 日目から 10 日目には、腫瘍細胞はほとんど消失し、壊死組織が認められた。N 群では、2 日目には I 群と同様に炎症性細胞浸潤を認め、4 日目から 6 日目には、腫瘍細胞の増殖と、その周囲に好中球ならびに単

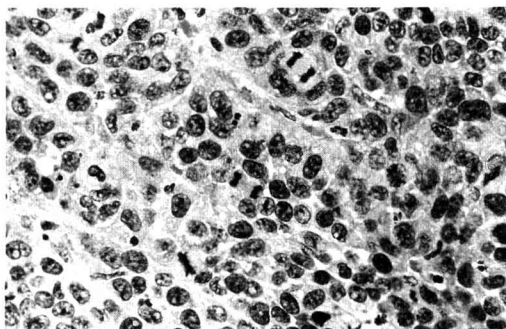


Fig. 2 Histopathological observation of poorly differentiated squamous cell carcinoma, spontaneously developed in WHT/Ht mouse (H.E stain X400).

核球の浸潤が認められた。10 日目には、腫瘍の活発な増殖と、一方では腫瘍組織の自壊も認められ、自壊した部位では炎症性細胞浸潤が認められた (Fig.3)。

2. Spleen index

脾臓の重量を測定し Spleen index を求めたところ、各群とも腫瘍移植後 4 日目まで徐々に増加し続けた。I 群では、4 日目から 6 日目にかけて急激に増加し、6 日目に 11.1 ± 1.5 と最大になり、以後腫瘍の縮小にともない減少した。N 群では 6 日目に 5.4 ± 0.3 、8 日目に 7.1 ± 0.1 と腫瘍の増殖にともない緩慢に増加し続けた (Fig.4)。

3. 所属リンパ節腫脹の経日的変化

I 群の腋下リンパ節は、腫瘍移植後 1 日目から腫大し始め、6 日目にその大きさが 4.4 ± 0.1 mm と最大になり、その後、腫瘍の縮小にともない腫脹は減少した。一方、N 群では 2 日目から腫脹が認められ、以後も徐々に増加し続けた (Fig.5)。

4. 免疫組織学的所見

I 群では N 群と比較して、腫瘍組織内に多くのリンパ球浸潤が認められた。腫瘍移植後 2 日目には、Mac-1⁺, asialo GM 1⁺ 細胞の浸潤が認められた。4 日目から 6 日目にかけて Mac-1⁺, s-Ig⁺, asialo GM 1⁺ 細胞の浸潤が著明となった。Lyt-1⁺, Lyt-2⁺, L3T4⁺ 細胞の浸潤は軽度であり、以後も浸潤程度に顕著な差は認められなかった。Fig.6 は、腫瘍移植後 6 日目の腫瘍組織の染色像を示すが、Mac-1⁺, s-Ig⁺, asialo GM 1⁺ 細胞の浸潤が著明であり、Lyt-1⁺, Lyt-2⁺, L3T4⁺ 細胞は軽度であった。

N 群では、腫瘍内に浸潤してきているリンパ球は少なかったが、I 群と同様、腫瘍移植後 2 日目より認められるようになった。4 日目から 6 日目にかけて Lyt-1⁺, Lyt-2⁺, L3T4⁺ 細胞の浸潤が認められたが、それ以後の各時期で浸潤程度に顕著な差は認められなかった。Fig.7 は腫瘍移植後 6 日目の腫瘍組織の染色像を示すが、Lyt-1⁺, L3T4⁺, Lyt-2⁺ 細胞が多く、それに対して、Mac-1⁺, asialo GM 1⁺ 細胞は

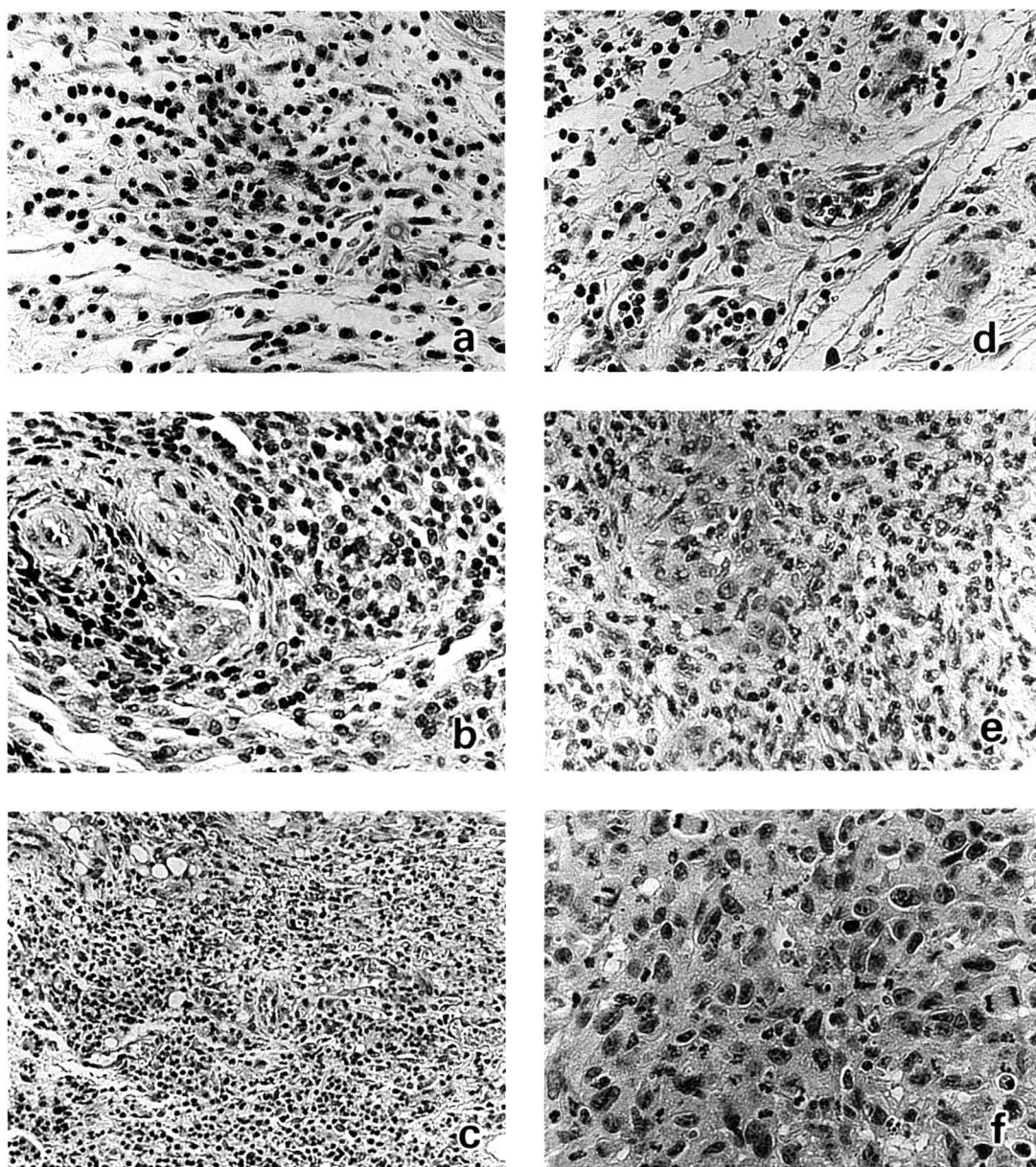


Fig. 3 Histopathological time-course observation of tumor tissues from immunized (a ~ c) and non-immunized mice (d ~ f).

- a : 2nd day after tumor implantation (H.E stain X400).
- b : 6th day after tumor implantation (H.E stain X400).
- c : 10th day after tumor implantation (H.E stain X400).
- d : 2nd day after tumor implantation (H.E stain X400).
- e : 6th day after tumor implantation (H.E stain X400).
- f : 10th day after tumor implantation (H.E stain X400).

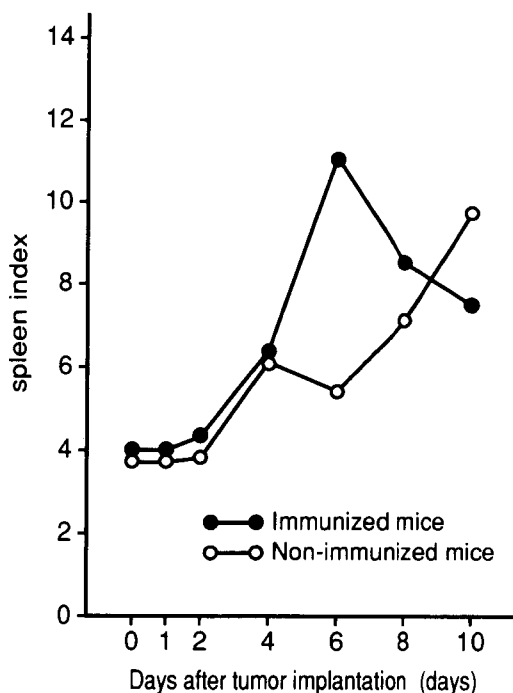


Fig. 4 Spleen indices of immunized and non-immunized mice after implantation of 1×10^6 viable tumor cells. The results are expressed as means of three mice.

少なかった。

5. リンパ球 subset 分析

FACScan によるリンパ球 subset 分析の結果を Fig. 8 に示した。I 群 TIL の subset は、s-Ig⁺ 細胞が 37%、Mac-1⁺ 細胞が 29%、asialo GM 1⁺ 細胞が 24% と、これらの占める割合が多かったが Lyt-1⁺ 細胞は 11% と少なく、L3T4⁺ 細胞は 6%、Lyt-2⁺ 細胞は 5% であった。N 群 TIL の subset は Lyt-1⁺ 細胞が 66% と多く、L3T4⁺ 細胞は 46%、Lyt-2⁺ 細胞は 19% だった。s-Ig⁺ 細胞は 25%、Mac-1⁺ 細胞は 11%、asialo GM 1⁺ 細胞は 9% だった。I 群 TIL の Mac-1⁺、asialo GM 1⁺ 細胞の占める割合が、N 群のそれらに比較して約 3 倍も多かった。また、N 群 TIL の Lyt-1⁺ 細胞の占める割合は、I 群のそれに比較して約 6 倍多かった。

I 群脾細胞は、Lyt-1⁺ 細胞が 14%、L3T4⁺ 細胞が 10%、Lyt-2⁺ 細胞が 4% であり、Mac-

Axillary lymph node

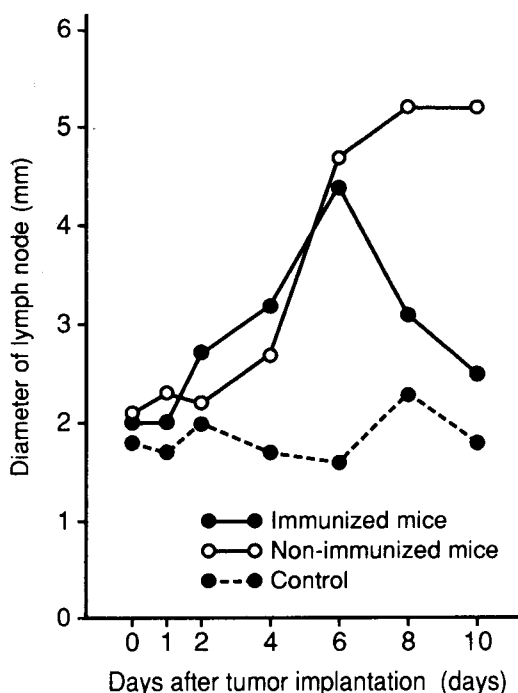


Fig. 5 Kinetic analysis of regional lymph node enlargement in immunized and non-immunized mice. Lymph node size indicates the average of the largest lymph node diameter and a second diameter perpendicular to the first. The size of the left side regional lymph node at implantation (1×10^6 viable tumor cells) was measured every 2 days, and size of the right regional lymph node, measured but having no implantation, was used as control. The diameters of three lymph nodes were plotted together with mean \pm SEM.

1⁺ 細胞が 52%、s-Ig⁺ 細胞が 44%、asialo GM 1⁺ 細胞が 15% であった。N 群脾細胞では Lyt-1⁺ 細胞が 35%、L3T4⁺ 細胞が 27%、Lyt-2⁺ 細胞が 10% であり、s-Ig⁺ 細胞が 45%、Mac-1⁺ 細胞が 18%、asialo GM 1⁺ 細胞が 6% であった。正常マウスの脾細胞の subset は、Lyt-1⁺ 細胞が 54% であり、そのうち L3T4⁺ 細胞が 35%、Lyt-2⁺ 細胞が 15% であった。また、s-Ig⁺ 細胞が 36%、asialo GM 1⁺ 細胞が 9%、Mac-1⁺ 細胞が 6% であった。これら 3 群

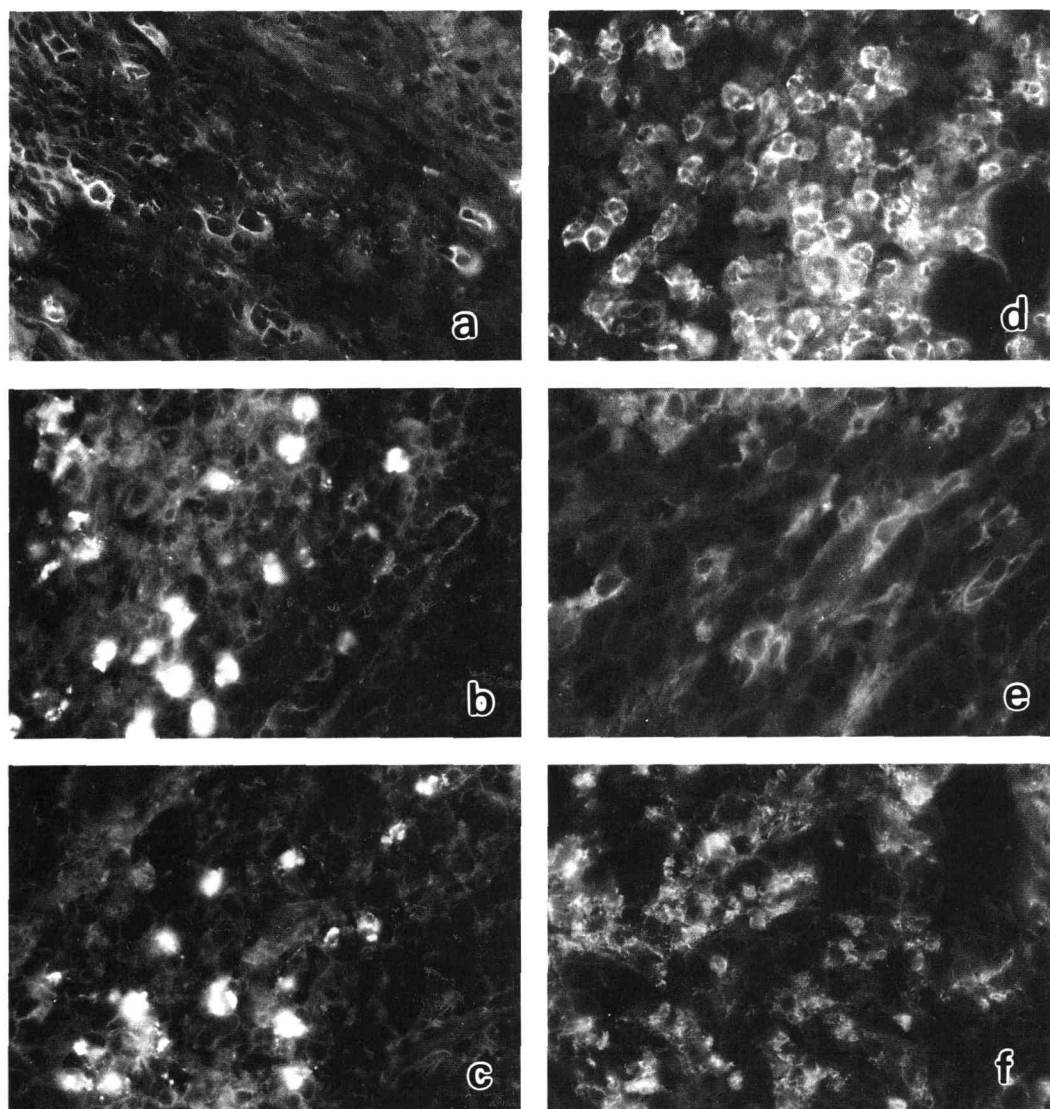


Fig. 6 Immunohistological investigation of TIL from immunized mice at the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells. TIL were detected by a fluorescent antibody method with anti-Lyt-1 (a), anti-Lyt-2 (b), anti-L3T4 (c), anti-Mac-1 (d), and anti-asialo GM1 (e); the second antibodies were labelled with FITC. FITC-labelled anti-mouse Ig was used for detection of surface Ig (f). (X400)

を比較するとI群脾細胞は、N群脾細胞、あるいは正常マウス脾細胞に比較して、Mac-1⁺細胞が多く、Lyt-1⁺、Lyt-2⁺、L3T4⁺細胞が少なかった。また、asialo GM1⁺細胞は軽度増加したが、s-Ig⁺細胞の割合はほぼ同じであった。N群脾細胞では正常マウス脾細胞に比較して、Mac-1⁺、s-Ig⁺細胞の割合が多く、

Lyt-1⁺、Lyt-2⁺、L3T4⁺細胞の割合が少なかった。

TILの採取量は、N群が 5.5×10^5 個/gであったのに対し、I群では 6.3×10^6 個/gとN群の11.5倍であった。

6. 細胞傷害活性

各実験群のTILおよび脾細胞の腫瘍細胞に

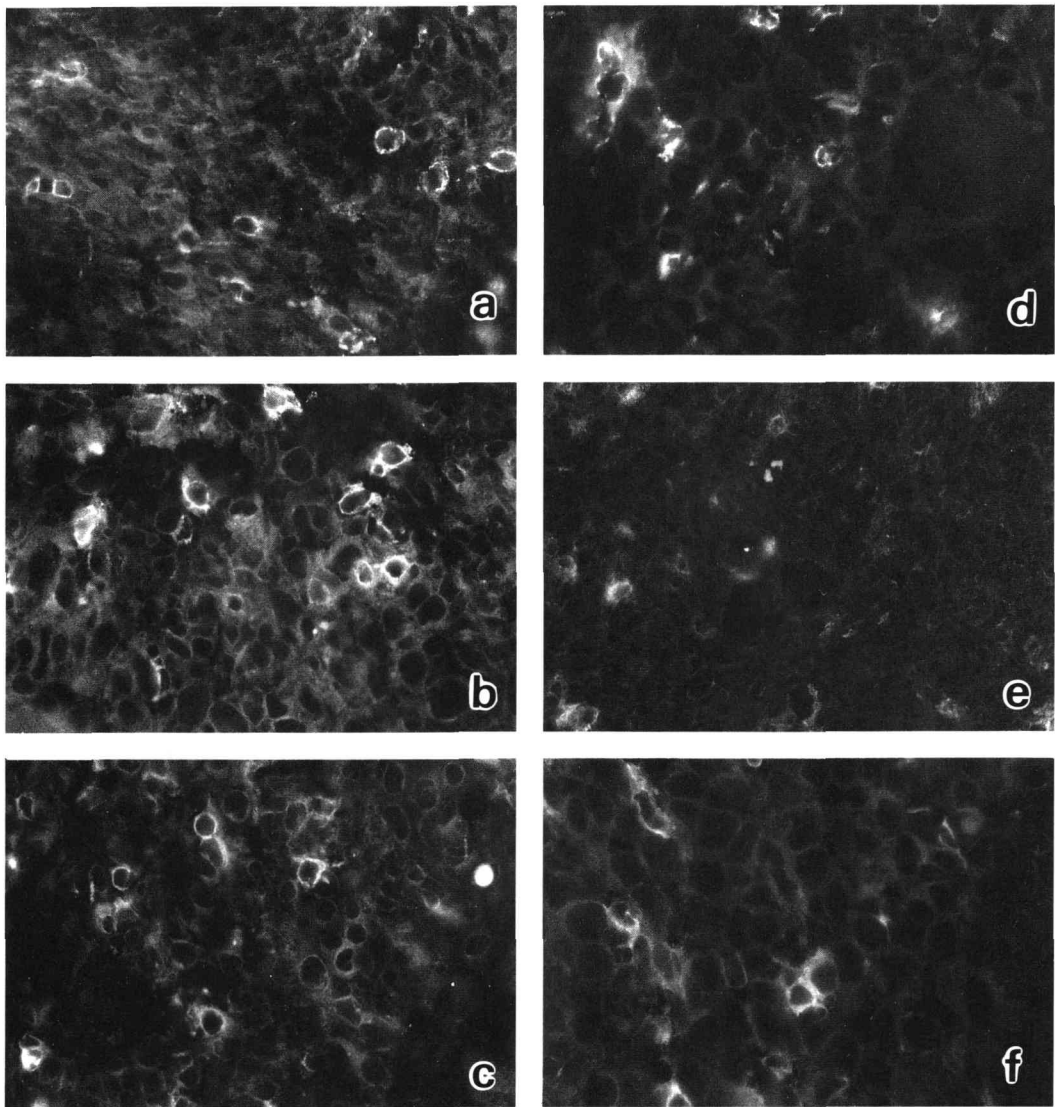


Fig. 7 Immunohistological investigation of TIL from non-immunized mice at the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells. TIL were detected by a fluorescent antibody method with anti-Lyt-1 (a), anti-Lyt-2 (b), anti-L3T4 (c), anti-Mac-1 (d), and anti-asialo GM1 (e); the second antibodies were labelled with FITC. FITC-labelled anti-mouse Ig was used for detection of surface Ig (f). (X400)

対する細胞傷害活性, ならびに YAC-1 細胞に対する NK 活性を, E:T 比が 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1, 12 時間培養で実験を行った結果を Table 1, Fig.9 に示した。

I 群 TIL の細胞傷害活性は, E:T 比が 100:1 で 18.7% と最大値を示した。I 群脾細胞の細胞傷害活性は E:T 比が 100:1 で 15.3% で

あった。

N 群 TIL, 脾細胞および正常マウス脾細胞には, 腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は認められなかった。

I 群 TIL の NK 活性は, E:T 比が 100:1 で 10.7% と最大値を示し, I 群脾細胞では, E:T 比が 100:1 で 7.3% であった。N 群脾細胞

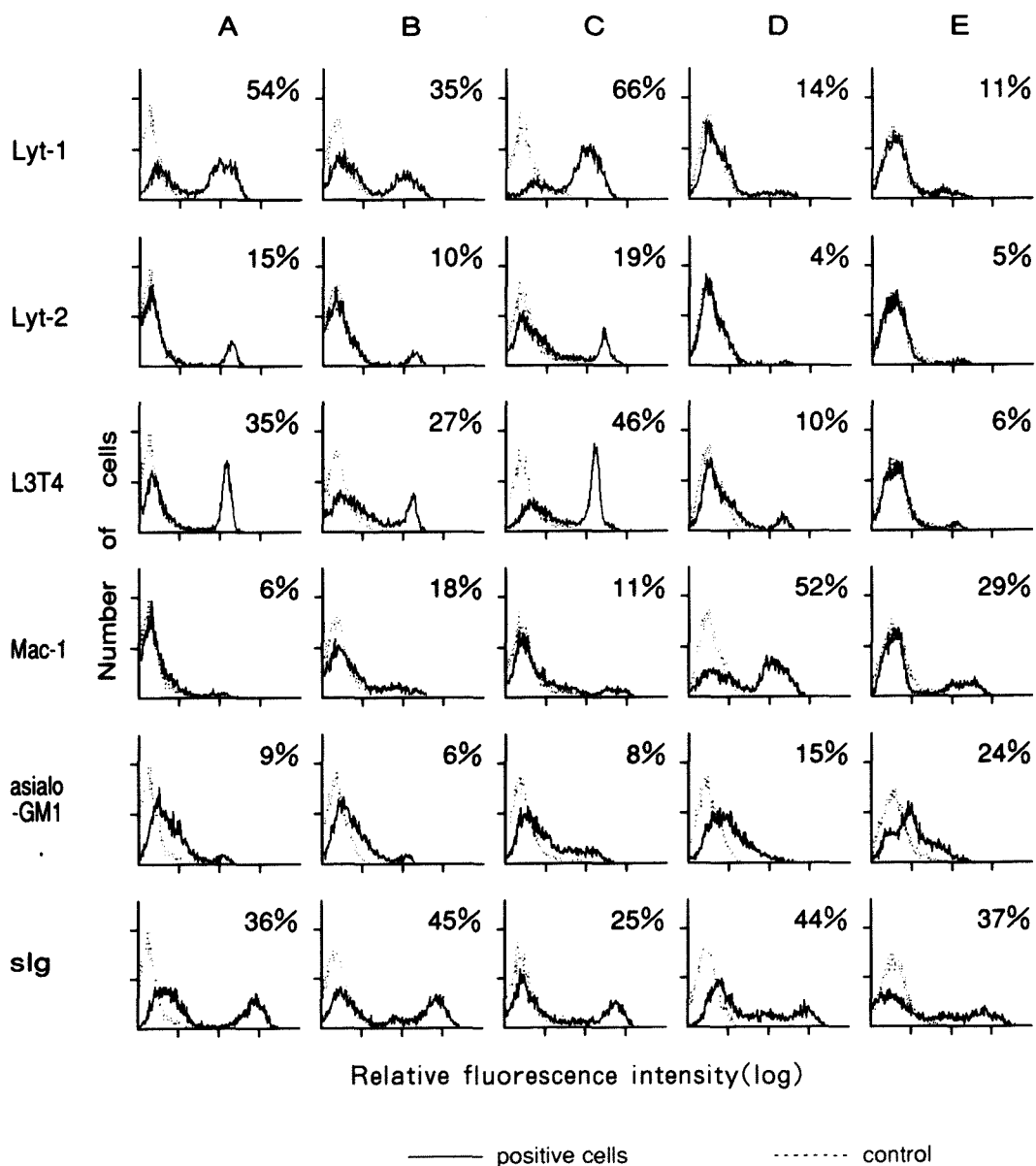


Fig. 8 Phenotypic analysis of lymphocytes by flow cytometry (FACScan). Lymphocytes were obtained from spleen cells of normal mice (A), spleen cells (B) and TIL (C) of non-immunized mice at the 6th day after tumor cells implantation, and spleen cells (D) and TIL (E) of immunized mice on the 6th day after tumor cells implantation. These were stained using various monoclonal antibodies (anti-Lyt-1, -Lyt-2, -L3T4, -Mac-1, -asialoGM1) on the surface markers, and are shown as FITC-labelled secondary antibodies. FITC-labelled anti-mouse Ig was used for detection of surface Ig.

のNK活性は、E:T比が100:1で3.6%と軽度認められた。

N群TILおよび正常マウス脾細胞ではNK

活性は認められなかった。

7. ADCC活性

E:T比100:1に、血清濃度が1/5、

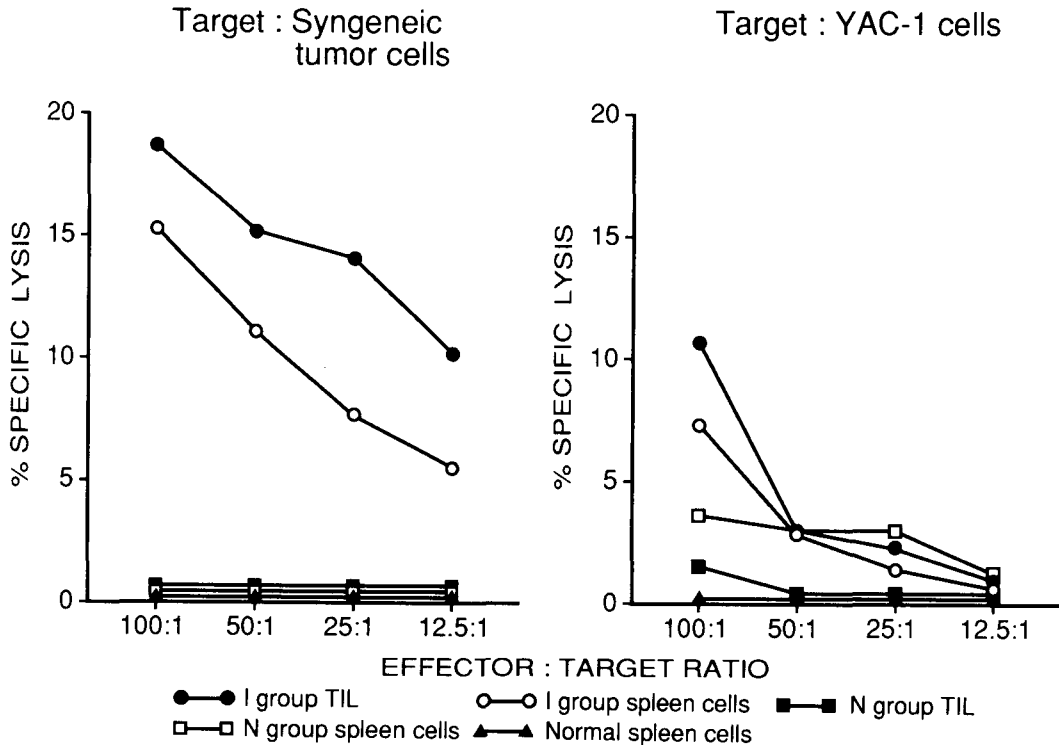


Fig. 9 Cytolytic activities of TIL (●—●) and spleen cells (○—○) on the 6th day after implantation of tumor cells rejected by immunized mice, TIL (■—■) and spleen cells (□—□) on the 6th day after implantation of tumor cells from non-immunized mice, and spleen cells (▲—▲) from normal mice. These lymphocytes were tested for cytolytic activity against fresh syngeneic tumor cells and YAC-1 cells as effector : target (E : T) ratios of 100:1, 50:1, 25:1 and 12.5:1 in 12-hr ^{51}Cr release assay. Values represent the mean percentage of specific lysis from triplicate determinations.

Table 1. Cytolytic activities of TIL and spleen cells.

Target cells	Effector cells	% specific lysis ^a at E:T ratio ^b :			
		100:1	50:1	25:1	12.5:1
Syngeneic tumor cells	Group I TIL ^c	18.7±1.9**	15.2±0.1**	14.1±0.6**	10.2±0.2**
	Group I spleen cells ^c	15.3±2.7*	11.1±1.7**	7.7±1.0**	5.5±0.2**
	Group N TIL ^d	0	0	0	0
	Group N spleen cells ^d	0	0	0	0
	Normal mouse spleen cells	0	0	0	0
YAC-1 cells	Group I TIL ^c	10.7±2.3**	3.0±2.2	2.3±1.7	1.7±1.2
	Group I spleen cells ^c	7.3±0.4**	2.8±0.7*	1.4±0.7	1.3±0.1
	Group N TIL ^d	1.5±2.1	0.4±1.2	0.4±1.2	0
	Group N spleen cells ^d	3.6±0.7**	3.0±0.9**	0.5±0.9	0
	Normal mouse spleen cells	0	0	0	0

a : Values are expressed as mean \pm SEM from three separate experiments.

b : The number of target cells is 1×10^4 .

c : TIL and spleen cells were collected from immunized mice on the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells.

d : TIL and spleen cells were obtained from non-immunized mice on the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells.

e : Statistical analysis was performed by Student's t test.

Significantly different from control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Table 2. ADCC of TIL and spleen cells.

Target cells	Effector cells	E:T ratio ^d :	% ADCC ^b at dilution of serum ^c :			
			1/5	1/20	1/80	1/320
Syngeneic tumor cells	Group I TIL ^d	100:1	7.7±0.7 ^f **	7.3±4.4 ^{**}	0.3±1.7	0
	Group I spleen cells ^d	100:1	20.9±0.5 ^{**}	21.1±4.0 ^{**}	14.8±9.9 [*]	9.1±4.4 ^{**}
	Group N TIL ^e	100:1	0	0	0	0
	Group N spleen cells ^e	100:1	0	0	0	0

a: The number of target cells is 1×10^4 .

b: Values are expressed as mean \pm SEM from three separate experiments.

c: Sera were obtained from immunized and non-immunized mice, and heat-inactivated for 30 min on 56°C.

d: TIL and spleen cells were obtained from immunized mice on the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells.

e: TIL and spleen cells were obtained from non-immunized mice on the 6th day after implantation of 1×10^6 tumor cells.

f: Statistical analysis was performed by Student's t test.

Significantly different from control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

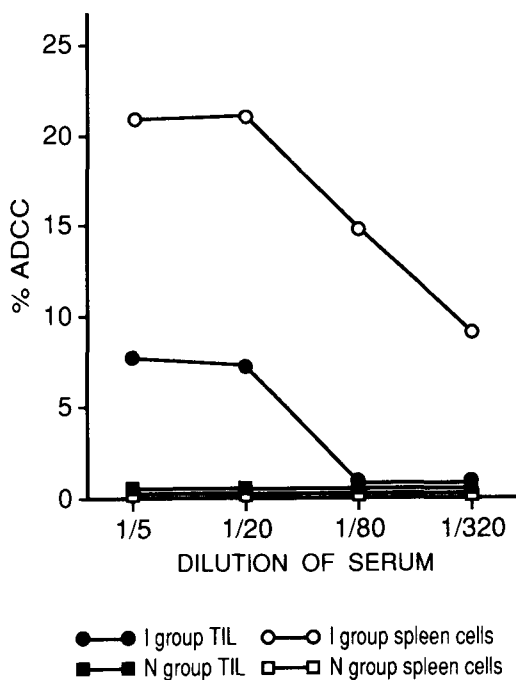


Fig. 10 ADCC of TIL (●—●) and spleen cells (○—○) on the 6th day after implantation of tumor cells from immunized mice, TIL (■—■) and spleen cells (□—□) on the 6th day after implantation of tumor cells from non-immunized mice. ADCC was determined by 6-hr ^{51}Cr release assay with E:T ratio of 100:1 in the serum which was obtained from immunized or non-immunized mice. Values represent the mean percentage of specific lysis from triplicate determinations for each dilution of serum.

1/20, 1/80, 1/320, 6時間培養で実験を行ったところ, I群 TIL の ADCC 活性は, 血清濃度が 1/5 で 7.7%, 1/20 で 7.3% であった。I群脾細胞の ADCC 活性は, 1/5 で 20.9%, 1/20 で 21.1% と最大値を示した。

N 群 TIL および脾細胞では ADCC 活性は認められなかった。(Table 2, Fig. 10)。

考 察

TIL の浸潤は, 組織学的に悪性腫瘍に認められる特徴の一つである。Handley¹⁾ によって最初に報告されて以来, TIL の浸潤程度と, 臨床病態および患者の予後との関連についての解析がなされ, TIL は担癌宿主の抗腫瘍免疫反応であることが示唆されてきた²⁻⁶⁾。Ito ら⁹⁾ の報告では, 転移性メラノーマより分離した TIL は, $\text{CD}3^+$, Class I 拘束性で, 著しい自己腫瘍特異的 cytotoxic T lymphocyte (CTL) 活性を示すが, 肉腫, 腎細胞癌より採取した TIL では, CTL 活性は低く, 末梢血と同様の生物活性を有しているにすぎないとしている。このように, 腫瘍に対する宿主の免疫応答は広いスペクトルを持った反応であり, それは腫瘍局所において最も直接的に現れると考えられる。したがって, 腫瘍に対する免疫応答に関与する TIL について, その性状, 機能を解析し検討することは極めて有用である。

近交系 WHT/Ht マウスに自然発生した扁平

上皮癌は、Hewitt ら¹⁶⁾により極めて低抗原性であることが指摘され、免疫応答の弱いヒト癌のモデルに当てはめられる。一方、この動物腫瘍系においては、弱いながらも腫瘍関連抗原が存在することや、これに特異的な免疫応答が成立することが明らかにされている²⁵⁻²⁹⁾。

そこで今回、著者は、免疫マウスと非免疫マウスに腫瘍を移植し、その TIL を分離し、性状ならびに機能について解析するとともに、腫瘍に対する生体の免疫応答の差異を検討した。

TIL の分離方法は、一般的に広く用いられている比重遠心法²⁰⁾で行なった。本法は、比較的簡単な操作で、リンパ球画分構成に影響を与えず、効率よく高い回収率で TIL を分離できる有用な方法である。しかし、数%の腫瘍細胞の混入は避けることができず、また、遠心操作により細胞への影響を及ぼすこともあるなどの問題点があげられるが、本実験では、腫瘍細胞の混入率は6%以下であり、リンパ球の viability は90%以上と、比較的实验への影響は少なかった。

リンパ球表面マーカーの解析は、モノクローナル抗体を使用した免疫組織学的検索で行った。この方法は、組織切片上におけるリンパ球 subset の動態を知る上で優れている方法であるが、リンパ球は組織内で不均一に分布しているため、客観性に欠けるという問題点も指摘されている。この点 FACSscan を用いた方法は²¹⁾、解析対象の細胞群を同定する際の客観性にすぐれ、かつ迅速に解析することができるばかりでなく、応用範囲が広く、有用性が極めて高い方法である。本実験では、より信頼性の高い結果が得られるように、免疫組織学的検索と FACSscan を併用した。

腫瘍移植後の宿主の全身の免疫応答として脾重量の測定を、また、局所の免疫応答として所属リンパ節の腫大を測定した。その結果 I 群は N 群に比較して、脾臓、およびリンパ節は腫瘍の消長と平行して鋭敏に変化したが、N 群では、腫瘍移植後の初期の脾臓および、所属リンパ節反応が緩慢であり、腫瘍の増殖とともに継

続的な腫大を認めた。このように、脾臓、およびリンパ節は全身と局所の腫瘍に対する反応を如実に反映するものと思われた。特に I 群マウスは頻回の免疫操作により腫瘍細胞に感作され、N 群マウスとは異なり、抗腫瘍活性を担う免疫担当細胞が生体内で蓄積され、抗原の再刺激に対していち早く対応できる状態にあることを表わしている。

リンパ球 subset 分析は、腫瘍移植後6日目に行ったが、これは、I 群マウスにおいて腫瘍移植後の宿主の経日的変化がピークとなる時期であった (Fig.3, 4, 5)。その結果、I 群 TIL は、s-Ig⁺, Mac-1⁺, asialo GM 1⁺細胞の浸潤が著明に認められ、Lyt-1⁺細胞は少なかった。N 群では、Lyt-1⁺, L3T4⁺細胞が優位であり、Mac-1⁺, asialo GM 1⁺細胞は少なかった。このような I 群と N 群の TIL subset の差は、腫瘍移植局所での腫瘍細胞に対する免疫応答が大きく異なることを示し、I 群 TIL は、腫瘍拒絶を initiate または mediate する機能を有するリンパ球であり、N 群 TIL は、このような機能を持たないか、あるいは抑制されており、腫瘍の増殖を許容してしまうリンパ球と推測される。さらに、I 群で Mφ などの特定の細胞が腫瘍局所に浸潤しているのは、chemotaxis を起す遊走因子^{11, 30-32)}や細胞接着因子³³⁻³⁶⁾の関与が考えられた。

I 群脾細胞の subset は、Mac-1⁺, s-Ig⁺細胞がほとんどを占め、Lyt-1⁺細胞は少なく、N 群脾細胞では、Lyt-1⁺, L3T4⁺, s-Ig⁺細胞が多くを占め、Mac-1⁺, asialo GM 1⁺細胞は少なかった。また、I 群と N 群の脾細胞の subset は、対照群のそれと比較して異なっており、I 群において顕著であった。さらに、I 群の TIL と脾細胞の subset の分布はほぼ一致していたが、N 群では異なっていた。このことは、I 群と N 群では、腫瘍に対する宿主の全身の免疫応答が異なっており、I 群では、全身の免疫応答が局所に反映されているが、N 群では反映されていないことが示唆された。

TIL および脾細胞の腫瘍細胞に対する細胞

傷害活性について検討したところ、I 群 TIL は強い細胞傷害活性を示したが、N 群 TIL では示さなかった。また、I 群脾細胞は細胞傷害活性を示したが、TIL に比較して低く、N 群脾細胞および対照群では示さなかった。このように、I 群と N 群で TIL の細胞傷害活性が異なるのは、TIL の subset の分布の差、ならびに TIL の腫瘍細胞に対する免疫寛容性の差によるためと思われた。また、I 群脾細胞と、N 群脾細胞および対照群とで細胞傷害活性が異なるのは、TIL の場合と同様に、脾細胞の subset の分布の差、ならびに脾細胞の腫瘍細胞に対する免疫寛容性の差が考えられた。さらに、N 群脾細胞と対照群とでは subset の分布が異なるのに、両者とも活性が認められないのは、生体内のリンパ球が腫瘍に感作されておらず、腫瘍を認識し傷害することができないためと思われた。

I 群において、TIL と脾細胞の subset の分布は、ほとんど差がないにもかかわらず、TIL の方が強い細胞傷害活性を示したのは、腫瘍局所におけるリンパ球の分化成熟の程度が異なるためと思われた。

TIL および脾細胞の NK 活性について検討したところ、I 群 TIL は NK 活性を示したが、N 群 TIL では示さなかった。また、I 群脾細胞と N 群脾細胞は軽度の NK 活性を示したが、I 群 TIL に比較して低く、対照群では示さなかった。このことは、I 群においては、NK 活性を担う asialo GM 1⁺細胞の占める割合が多いためと考えられ、また、N 群脾細胞においても腫瘍細胞の移植によって、わずかではあるが NK 細胞が活性化されていることが推測された。

TIL および脾細胞の腫瘍細胞に対する ADCC 活性について検討したところ、I 群 TIL は ADCC 活性を示したが、N 群 TIL では示さなかった。I 群脾細胞は I 群 TIL の 2 倍以上の高い ADCC 活性を示したが、N 群脾細胞では示さなかった。このことは ADCC 活性は B 細胞が産生する抗腫瘍特異抗体と Mφ などの細

胞表面に Fc receptor を有する細胞による特異な腫瘍細胞破壊機構³⁷⁾であるので、I 群には、抗腫瘍特異抗体が存在し、なおかつ Mac-1⁺, s-Ig⁺細胞の占める割合が、N 群に比較して多いためと思われた。I 群脾細胞が高い活性を示したことは、ADCC 活性を担うとされている Mφ の占める割合が TIL におけるよりも高いためと思われた。

本実験における TIL について総括してみると、I 群マウスの TIL は s-Ig⁺, Mac-1⁺, asialo GM 1⁺細胞が多く、さらにこれらが effector 細胞として腫瘍細胞に対して、細胞傷害活性、ADCC 活性、および NK 活性を示した。また、先に阿部²⁹⁾は、本実験と同じ動物腫瘍系において、非担癌状態の免疫マウス脾細胞では、anti-Thy 1.1 + C 処理により、細胞傷害活性は 91.8% 抑制され、anti-Lyt 2.2 + C 処理により、細胞傷害活性が 84.9% 抑制されることから、抗腫瘍活性の中心は CTL であるとしている。しかし、本実験の担癌状態の免疫マウス脾細胞では、Mac-1⁺細胞が 52%, s-Ig⁺細胞が 44% と多く、Lyt-1⁺細胞が 14%, Lyt-2⁺細胞が 4% と少なかった。このことは、非担癌状態と担癌状態の相違であるとも考えられ、腫瘍局所の TIL の分布にも反映しており、極めて興味深い結果であった。腫瘍局所には、割合は少ないが、Lyt-1⁺, Lyt-2⁺細胞の浸潤が認められ、担癌状態であっても、腫瘍拒絶の一翼を担っているのではないかと推測された。

N 群マウスの TIL は、Lyt-1⁺, L3T4⁺細胞が多いが、抗腫瘍活性は認められなかった。その原因の大半は、腫瘍拒絶抗原 tumor rejection antigen (TRA) が存在するとしてもその免疫原性が弱く、十分な免疫応答を誘導できないことによると推測された。また、N 群マウスの TIL は I 群と異なり、腫瘍を認識し排除する能力が弱いことや、*in vivo* prime されていても何らかの原因で活性化のシグナルが阻止されていることが考えられる。

本実験に使用した腫瘍は低抗原性であるため、細胞表面の TRA の発現は少なく、腫瘍特

異的 CTL, ADCC のみでは腫瘍を拒絶しきれないことが推測された。しかし、免疫マウスでは移植した腫瘍が完全に拒絶され、しかも腫瘍移植局所には NK, Mφ などの TRA と関連なく抗腫瘍活性を示す effector 細胞の浸潤が、多く認められたことから、これらが TRA を発現していない腫瘍細胞を標的としていることが推測された。このことは、腫瘍の拒絶が特定の細胞群だけで起きるのではなく、特異的、あるいは非特異的な種々の effector 細胞の共同作用によって、惹起されることが示唆された。濱岡³⁸⁾は、これらの抗腫瘍免疫反応は、免疫担当細胞間の相互作用によりもたらされると報告しており、本実験でも同様の機構が働いていることが推測された。

本実験においては、I 群 TIL が脾細胞に比較して高い細胞傷害活性を示したことから、とりわけ腫瘍移植局所において抗腫瘍免疫応答が増強されており、腫瘍に対する拒絶反応は、局所に浸潤してきている免疫担当細胞間の、複雑な相加相乗作用によってもたらされたと考えられるが、その解明には今後の検討が必要と思われる。

結 論

近交系 WHT/Ht マウス自然発生扁平上皮癌の継代移植腫瘍を用いて、免疫、および非免疫マウスの TIL, 脾細胞の性状ならびに機能の検索を行ない、腫瘍に対する宿主の免疫応答の差異を検討した結果、以下の結論を得た。

1. I 群では、腫瘍組織内に著しいリンパ球浸潤が認められ腫瘍が拒絶されるのに対し、N 群では、腫瘍組織内のリンパ球浸潤に乏しく、腫瘍は増殖し続け腫瘍死した。
2. 腫瘍移植後、脾臓および所属リンパ節における免疫反応は、腫瘍拒絶の有無にかかわらず認められた。
3. 免疫組織学的検索および FACScan により、I 群の腫瘍組織中には、s-Ig⁺, Mac-1⁺, asialo GM 1⁺ 細胞が多く浸潤していたが、N 群では、Lyt-1⁺, L3T4⁺ 細胞の浸潤が優位で

あった。

4. TIL の subset の分布と、脾細胞の subset の分布について検索したところ、I 群はほぼ一致していたが、N 群では異なっていた。さらに I 群では、TIL の浸潤が腫瘍局所に多く認められたことから、全身の免疫応答が腫瘍局所に反映されていることが示唆された。

5. TIL と脾細胞の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を測定したところ、I 群において細胞傷害活性を認め、TIL は脾細胞に比較して高いものであったが、N 群の TIL, 脾細胞には認められなかった。

6. TIL と脾細胞の NK 活性を測定したところ、I 群の TIL, 脾細胞、および N 群脾細胞において軽度には認められたが、N 群の TIL には認められなかった。

7. TIL と脾細胞の ADCC 活性を測定したところ、I 群において ADCC 活性が認められ、TIL に比較し脾細胞がより高い活性を示したが、N 群の TIL, 脾細胞には認められなかった。

8. 以上の結果より、腫瘍免疫が成立し腫瘍を拒絶するようになったマウスでは、腫瘍移植局所に抗腫瘍活性を持った免疫担当細胞が浸潤し、種々の effector 機構が腫瘍拒絶に働いていることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また終始御親切な御指導、御鞭撻をいただいた当講座深澤肇講師に衷心より感謝の意を表します。近交系 WHT/Ht マウスを提供して下さいました、東北大学医学部放射線医学講座坂本澄彦教授に深謝いたします。さらに本学口腔解剖学第二講座立花民子助教授、ならびに口腔病理学講座武田泰典講師に深謝いたします。貴重な器材の使用を御快諾頂き御懇切な御助言を賜った本学産婦人科学講座西谷 巖教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に際し、御助言を頂きました

当講座結城勝彦助教授に深く感謝するとともに、口腔外科学第二講座医局員各位に心より謝意を表します。

本論文の要旨は、1991年5月17日第45回日本口腔科学会総会にておいて発表した。

参 考 文 献

- 1) Handley, W.S. : The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. *The Lancet* 1 : 927-933, 1907.
- 2) Black, M.M., Opler, S.R. and Speer, F.D. : Microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes in relation to survival. *S. G. O.* 98 : 725-734, 1954.
- 3) Black, M.M., Freemann, C., Mork, T., Harvei, S. Cutler, S.J. : Prognostic significance of microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymph nodes. *Cancer* 27 : 703-711, 1971.
- 4) Bloom, H.J.G. and Field, J.R. : Impact of tumor grade and host resistance on survival of women with breast cancer. *Cancer* 28 : 1580-1589, 1971.
- 5) Bennett, S.H., Futrell, J.W., Roth, J.A., Hoye, R.C. and Ketcham, A.S. : Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. *Cancer* 28 : 1255-1265, 1971.
- 6) Hiratsuka, H., Imamura, M., Ishii, Y., Kohama, G. and Kikuchi, K. : Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. *Cancer* 53 : 2456-2466, 1984.
- 7) Rosenberg, S.A., Spiess, P. and Lafreniere, R. : A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233 : 1318-1321, 1986.
- 8) Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C., Seipp, C.A., Simpson, C., Bock, C.C.S., Schwartzentruber, D., Wei, J.P. and White, D.E. : Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 319 : 1676-1680, 1988.
- 9) Ito, K., Platsoucas, C.D. and Balch, C.M. : Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. *J. Exp. Med.* 168 : 1419-1441, 1988.
- 10) Topalian, S.L., Solomon, D. and Rosenberg, S.A. : Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J. Immunol* 142 : 3714-3725, 1989.
- 11) Yamaki, T., Uede, T. and Kikuchi, K. : Cellular mechanisms of tumor rejection in rats. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 9 : 1-25, 1990.
- 12) Key, M. and Haskill, J.S. : Immunohistologic evidence for the role of antibody and macrophages in regression of the murine T1699 mammary adenocarcinoma. *Int. J. Cancer* 28 : 225-236, 1981.
- 13) Rios, A.M., Miller, F.R. and Heppner, G.H. : Characterization of tumor-associated lymphocytes in a series of mouse mammary tumor lines with differing biological properties. *Cancer Immunol. Immunother.* 15 : 87-91, 1983.
- 14) Hewitt, H.B. and Sakamoto, K. : The comparative survival of clonogenic cells of a murine epiderioma after irradiation in mice breathing air, oxygen and carbon dioxide, or hyperbaric oxygen. *Br. J. Radiol.* 44 : 457-463, 1971.
- 15) Katoh, H. : Biochemical marker profiles of inbred strains of the mouse. 実験動物特別委員会編；文部省がん特別研究(1)「がん研究に用いられる実験動物」, 柴原出版, 神戸, 155-161ページ, 1989.
- 16) Hewitt, H.B., Blake, E.R. and Walder, A.S. : A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of murine tumors of spontaneous origin. *Br. J. Cancer* 33 : 241-259, 1976.
- 17) Ibayashi, Y., Uede, T., Uede, T. and Kikuchi, K. : Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors : Differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and nonimmune rats. *J. Immunol.* 134 : 648-653, 1985.
- 18) Ford, W.L. : Chapter 30, Measurement of graft-versus-host activity : The spleen weight assay. Weir, D.M. ed., Handbook experimental Immunology, 3rd. ed., Alden Press, Oxford, pp7, 1978.
- 19) 川生 明 : 蛍光抗体法の原理と基本技術, 川生明著 ; 蛍光抗体法—その原理と技術および応用—第1版, ソフトサイエンス社, 東京, 2-41ページ, 1983.
- 20) 玉内秀一 : リンパ球系細胞の分離, 日本生化学会編 ; 分子免疫学 I 免疫細胞. サイトカイン 第1版, 東京化学同人, 東京, 22-23ページ, 1989.
- 21) 松田浩則, 八木田秀雄 : モノクローナル抗体を用いた細胞表面マーカーの解析, 実験医学, 6 : 943-952, 1988.
- 22) 奥野清隆, 水落利明, 藤原大英 ; キラー T 細胞の誘導 (in vivo sensitization) とその活性の測定 (cytotoxicity test), 日本免疫学会編 ; 免疫実験操作法 VIII 第一版, 前田印刷, 金沢, 3551-3563ページ, 1982.
- 23) Habu, S., Fukui, H., Shimamura, K., Kasai, M., Nagai, Y., Okumura, K. and Tamaoki, N. : In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK

- activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J. Immunol.* 127 : 34-38, 1981.
- 24) 小寺良尚 : ADCC, 矢田純一, 藤原道夫編 ; 新リンパ球機能検索法 第1版, 中外医学社, 東京, 210 - 222, 1987.
- 25) Fukazawa, H. : Immune responses of lymphocytes to spontaneous carcinoma cells of mice. *J. Iwate Med. Ass.* 32 : 911-916, 1980.
- 26) 船木康博 : マウス自然発生癌可溶性抗原に対するリンパ球の免疫応答に関する研究, 岩医大歯誌, 12 : 24 - 34, 1987.
- 27) 小野 実 : マウス自然発生癌の可溶性抗原の性状に関する研究, 岩医大歯誌, 13 : 283 - 289, 1988.
- 28) 宮野敦志 : マウス自然発生癌の腫瘍抗原の免疫原性に関する研究, 岩医大歯誌, 14 : 6 - 16, 1989.
- 29) 阿部美智夫 : 特異的, 非特異的免疫賦活時におけるマウス自然発生の免疫応答, 岩医大歯誌, 16 : 15 - 24, 1991.
- 30) Ziff, M. : Role of Endothelium in chronic inflammation. *Springer Semin. Immunopathol.* 11 : 199-214, 1989.
- 31) Honda, M. and Hayashi, H. : Characterization of three macrophage chemotactic factors from PPD-induced delayed hypersensitivity reaction sites in guinea pigs, with special reference to a chemotactic lymphokine. *Am. J. Pathol.* 108 : 171-183, 1982.
- 32) Kambara, T., Kawaguchi, T., Yamamoto, T. and Kukita, I. : Chemotactic factors for macrophages induced in vivo. *Macrophage Biology, Liss, New York, Vol 4* : 271-284, 1985.
- 33) Pals, S. T., Horst, E., Scheper, R. J. and Meijer, C. J. L. M. : Mechanisms of human lymphocyte migration and their role in the pathogenesis of disease. *Immunol. Rev.* 108 : 111-133, 1989.
- 34) Tomita, Y., Nishiyama, T., Watanabe, H., Fujiwara, M. and Sato, S. : Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on renal-cell cancer : Possible significance in host immune responses. *Int. J. Cancer* 46 : 1001-1006, 1990.
- 35) Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Lühowsky, S., Hemler, M. E. and Lobb, R. R. : VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60 : 577-584, 1990.
- 36) Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S. and Gimbrone, M. A. : Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 9238-9242, 1987.
- 37) 山崎正利 : マクロファージ介在 ADCC, *Oncologia*, 1 : 121-131, 1982.
- 38) 濱岡利之 : 癌の免疫を支配する宿主因子①概説, 山村雄一, 杉村 隆監修 ; 癌と免疫 第1版, メジカルビュー社, 東京, 11-19 ページ, 1987.